

20/05/00544

REC'D 07 JUN 2005

WIPO

PCT



Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

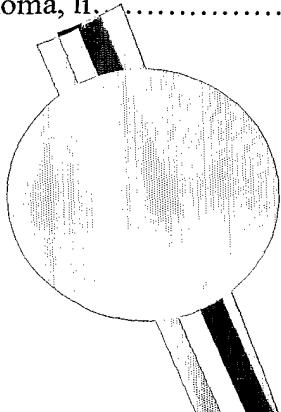


Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:
INVENZIONE INDUSTRIALE N. MI 2004 A 000388

Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali depositati con la domanda di brevetto sopra specificata, i cui dati risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

26 MAG. 2005

Roma, li.....



PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

IL FUNZIONARIO

Paola Gianni
Dra.ssa Paola Giuliano

MODULO A (1/2)

AL MINISTERO DELLE ATTIVITA' PRODUTTIVE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI (U.I.B.M.)
DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE N° _____

M 2004 A 0 0 0 3 8 8



A. RICHIEDENTE/I

COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1 GIULIANI S.P.A.		
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2 PG	COD.FISCALE PARTITA IVA	A3 00752450155
INDIRIZZO COMPLETO	A4 MILANO		
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1		
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2	COD.FISCALE PARTITA IVA	A3
INDIRIZZO COMPLETO	A4		
B. RECAPITO OBBLIGATORIO IN MANCANZA DI MANDATARIO			
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	B0	(D = DOMICILIO ELETTIVO, R = RAPPRESENTANTE)	
INDIRIZZO	B1		
CAP / LOCALITA' / PROVINCIA	B2		
C. TITOLO	C1		
ESTRATTO VEGETALE DI BOEHMERIA NIPPONONI VEA E UTILIZZO COME INIBITORE DI 5-ALFA-REDUTTASI			



D. INVENTORE/I DESIGNATO/I (DA INDICARE ANCHE SE L'INVENTORE COINCIDE CON IL RICHIEDENTE)

COGNOME E NOME	D1 GIULIANI GIAMMARIA		
NAZIONALITA'	D2		
COGNOME E NOME	D1 BENEDUSI ANNA		
NAZIONALITA'	D2		
COGNOME E NOME	D1 BELLINVIA SALVATORE		
NAZIONALITA'	D2		
COGNOME E NOME	D1 RINALDI FABIO		
NAZIONALITA'	D2		

E. CLASSE PROPOSTA	E1	E2	E3	E4	E5
--------------------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------

F. PRIORITA'

DERIVANTE DA PRECEDENTE DEPOSITO ESEGUITO ALL'ESTERO

STATO O ORGANIZZAZIONE	F1		TIPO	F2	
NUMERO DOMANDA	F3				
STATO O ORGANIZZAZIONE	F1		DATA DEPOSITO	F4	
NUMERO DOMANDA	F3				
G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICROORGANISMI	G1		TIPO	F2	
FIRMA DEL / DEI RICHIEDENTE / I	<i>Bellinvia</i>				

PROSPETTO MODULO A
DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE

NUMERO DI DOMANDA:

MI 2004 A 0 0 0 3 8 8

DATA DI DEPOSITO:

02 MAR 2004

A. RICHIEDENTE/I COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE, RESIDENZA O STATO ;
 GIULIANI SPA
 con sede in MILANO

C. TITOLO

"Estratto vegetale di Boehmeria nippononivea e utilizzo come inibitore di 5-alfa-reduttasi"

SEZIONE

CLASSE

SOTTOCLASSE

GRUPPO

SOTTOGRUPPO

E. CLASSE PROPOSTA

O. RIASSUNTO

La presente invenzione concerne l'uso di frazioni vegetali ottenute per estrazione con solvente i-droalcolico da Boehmeria nippononivea (o nippononivea) come inibitori della 5-alfa-reduttasi. Le frazioni vegetali estratte hanno un basso contenuto in acidi polinsaturi e trovano elezione di utilizzo sia nella preparazione di integratori alimentari e dietetici che di preparati ad uso topico per trattare l'alopecia androgenetica, il defluvium telegenico e l'eccessiva produzione cutanea di sebo.



P. DISEGNO PRINCIPALE

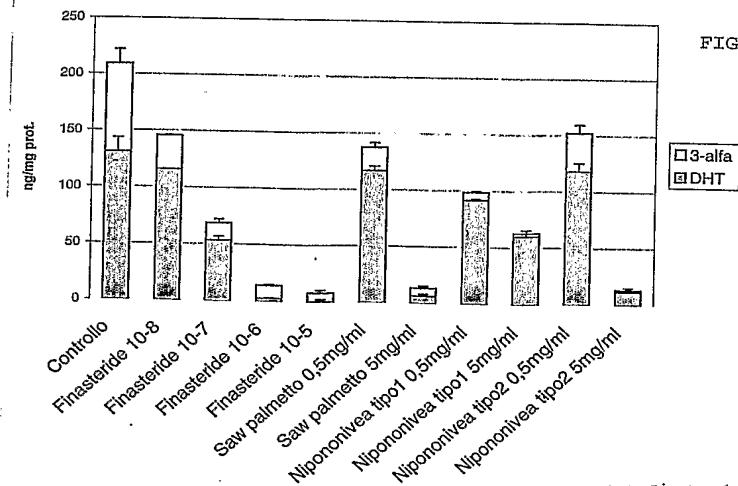


FIGURA 2

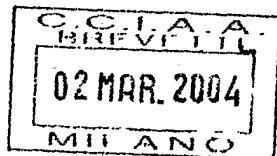
FIRMA DEL / DEI
 RICHIEDENTE / I

DESCRIZIONE dell'invenzione industriale

a nome: GIULIANI SPA

di nazionalità: italiana

con sede in: MILANO



M 2004 A 0 0 0 3 8 8

La presente invenzione si riferisce ad un estratto vegetale di Boehmeria nippononivea ed al suo utilizzo come inibitore della 5-alfa-reduttasi.

In particolare la presente invenzione si riferisce all'utilizzo di selezionate frazioni vegetali estratte da Boehmeria nippononivea per regolare il trofismo del bulbo capillare e delle cellule epiteliali - sebacee.

La presente invenzione origina nel settore delle preparazioni vegetali ed ha una ricaduta sia nel settore nutrizionale poiché gli estratti vegetali sono utilizzabili quali integratori alimentari sia nel settore farmaceutico e cosmetico poiché gli estratti esercitano un'azione di stimolazione del bulbo capillare.

Notoriamente i capelli sono una struttura a base cheratinica in rapida crescita, che necessita di una buona condizione fisica e di un corretto apporto di nutrienti per ottenere uno sviluppo regolare.

Una qualsiasi disfunzione ormonale, sanguigna,

metabolica, psichica, come pure un'alimentazione scompensata o carente, può avere effetti negativi sulla vita del capello; quindi una sua qualsiasi alterazione è una spia della salute generale di una persona.

La crescita dei capelli si verifica attraverso diverse fasi durante le quali il follicolo passa da periodi di intensa crescita a periodi di quiescenza metabolica e addirittura di involuzione. Queste fasi sono definite come anagen, catagen e telogen.

Anagen

Durante questa fase di crescita si verificano alcune modificazioni a livello della papilla dermica dove le cellule vivono una intensa attività metabolica. La durata della fase di anagen, cioè di crescita del capello, varia in media dai 3 ai 6 anni. I capelli durante la fase di anagen crescono di 0.3-0.4 mm al giorno, ma non sono mai tutti nella stessa fase di crescita, bensì si alternano.

Gli aminoacidi che sono nel sangue, passando attraverso la papilla dermica, sono sintetizzati in polipeptidi, cioè in complessi proteici che costituiscono chimicamente il capello (soprattutto la cheratina) e che ne determinano le caratteristiche finali.

Catagen

È la fase di involuzione, che dura da 2 a 3 settimane, durante la quale il follicolo pilifero subisce varie modificazioni morfologiche e metaboliche. Scompare il segmento inferiore, la lunghezza del follicolo si riduce di circa un terzo, il bulbo diminuisce di grandezza, i melanociti cessano la produzione di pigmento e la papilla diventa atrofica: il capello cade.

Telogen

E' la fase di riposo durante la quale il follicolo è completamente inattivo. Il capello si trova all'interno del follicolo, trattenuto da scarsi legamenti intercellulari che lo fanno restare nel cuoio capelluto fino all'inizio della nuova fase di anagen e talvolta anche per più fasi successive. La fase di telogen dura da 2 a 4 mesi.

A queste varie fasi del capello segue la sua caduta. Ogni giorno muoiono circa 50 capelli che, in condizioni ideali, vengono immediatamente sostituiti da nuovi elementi, perché i follicoli hanno cicli vitali sincronizzati tra di loro: infatti, il volume totale rimane invariato. Il ricambio dei capelli avviene ogni 2-6 mesi. Quando uno stress psicologico, un problema metabolico, un disturbo ormonale, oppure carenze di micronutrienti specifici intervengono a

rompere l'equilibrio esistente nella vita del follicolo e nella ricrescita del capello, può succedere che i follicoli in fase anagen passino a quella telogen determinando una caduta prematura.

Se lo stimolo stressante rimane, oppure se permane la condizione patologica, il capello può modificare il suo diametro e la sua lunghezza.

La normale crescita del capello e la sua durata sono quindi da mettere in relazione con una buona condizione del cuoio capelluto, con una buona vitalità della papilla, ma anche con la condizione psicosica generale dell'individuo e con un adeguato apporto di nutrienti.

La composizione elementare del capello e' la seguente:

- zolfo 5%, ossigeno 23%, azoto 15%, idrogeno 7%, carbonio 50%;
- sono presenti anche minime quantità di acidi grassi, tracce di metalli e minerali (fosforo, magnesio, sodio, ferro, potassio, iodio) che variano di percentuale in conseguenza delle condizioni dell'organismo e dell'alimentazione.

Il numero complessivo dei capelli che popolano la nostra testa è di circa 130.000 negli uomini e 150.000 nelle donne.



Come già accennato, fisiologicamente ciascuno giornalmente perde circa 50 capelli, che comunque sono sostituiti man mano da altri nuovi.

I problemi iniziano quando il bilancio va in passivo, perché i capelli caduti non sono tutti rimpiazzati. E' quello che accade, ad una certa età, a moltissimi uomini anche se da qualche tempo la calvizie sta colpendo anche le donne.

E' ovvio che qualsiasi meccanismo in grado di alterare uno o più di questi passaggi metabolici porta ad un blocco della crescita del capello, ad una interruzione della fase di anagen e del passaggio al telogen e ad una successiva caduta dei capelli.

L'induzione dell'apoptosi delle cellule della papilla dermica contribuisce ad innescare una patologia del capello.

Studi recenti hanno invece consentito di correggere la perdita dei capelli con una incrementata sensibilità di alcune strutture cutanee e pilifere ad un enzima, la 5-alfa-reduttasi. Si è in particolare verificato che il responsabile principale dell'alopecia androgenetica e del defluvium telegenico è la 5-alfa-reduttasi, enzima espresso principalmente proprio a livello delle cellule del follicolo. In particolare si è appurato che questo enzima trasforma il testo-

sterone, il principale ormone maschile, nel suo potente derivato diidrotestosterone o DHT, uno dei principali responsabili dell'alopecia androgenetica, del defluvium telogenico e della seborrea.

I follicoli delle aree del cuoio capelluto che sono soggetti a diradamento dei capelli producono infatti alte quantità di questo enzima e quindi alte quantità di DHT. Il DHT a sua volta interrompe il funzionamento normale dei follicoli dei capelli determinando una loro parziale o totale distruzione.

Poiché si è osservato che una diminuita produzione di DHT consente di prevenire un'ulteriore perdita di capelli, determinando nel contempo una ricrescita nelle aree calve o soggette a diradamento, sono stati sviluppati composti che bloccano l'attività della 5-alfa-reduttasi, determinando una diminuzione nei livelli di DHT.

Attualmente una delle principali sostanze utilizzate principalmente per somministrazione orale ma anche per l'applicazione topica al fine di bloccare la 5-alfa-reduttasi di tipo 2, è la finasteride.

Farmaci a base di finasteride hanno trovato un favorevole riscontro e si sono mostrati particolarmente efficaci nel trattare non solo l'alopecia e nel promuovere la ricrescita dei capelli ma vengono anche

nel prevenire l'ulteriore diradamento dei capelli e nell'incrementarne lo spessore.

La somministrazione di farmaci a base di finasteride non si è però rilevata scevra dal presentare effetti collaterali, anche di una certa gravità, quali riduzione della libido, impotenza, rush cutanei, riduzione del volume spermatico, oltre a influenzare negativamente l'esito di esami diagnostici del PSA. Inoltre, questo farmaco presenta il grave limite di non poter essere assunto dalle donne in particolare da quelle incinte poiché la sua presenza nel circolo sanguigno influenza lo sviluppo dei genitali del feto.

Altri autori hanno proposto di utilizzare estratti vegetali in grado di interagire con la 5-alfa-reduttasi.

Ad esempio Shimizu et al. hanno descritto su Biosi. Journal Biotech. Biochem. Vol. 64, numero 4, pagine 875-877 2000, l'attività sulla 5-alfa-reduttasi di un estratto con solvente organico acetonicico da *Boehmeria nippononivea*. L'estratto acetonico ottenuto ha un elevato contenuto di acidi polinsaturi.

Questo estratto non si è però dimostrato scevro dal presentare inconvenienti, in primis una ridotta

efficacia di inibizione della 5 alfa redattasi.

Inoltre, l'estratto vegetale descritto nella tecnica nota non trova applicazione nell'industria alimentare e dei prodotti dietetici per la presenza del solvente organico.

Allo stato attuale si sente pertanto l'esigenza di poter disporre di principi attivi di origine naturale ad attività anti 5-alfa redattasi, in particolare di tipo 2, che si rivelino efficaci nel prevenire e trattare la caduta dei capelli ed altre affezioni connesse con un'eccessiva attivazione della 5-alfa redattasi.

Uno degli scopi generali della presente invenzione consiste nel fornire un estratto vegetale che sia ricco in frazioni attive nell'inibire la 5 alfa reduttasi e nel regolare la crescita dei capelli.

Un altro scopo consiste nel fornire selezionate frazioni miste idro e lipo-solubili da *Boehmeria nipononivea* che siano utilizzabili nell'industria alimentare, farmaceutica e dei prodotti dietetici.

Un ulteriore scopo dell'invenzione consiste nel fornire un estratto vegetale che sia attivo nel regolare la crescita dei capelli e la cui somministrazione comporti bassi rischi di determinare effetti collaterali.

Non ultimo scopo consiste nel fornire preparazioni nutrizionali o dietetiche la cui assunzione svolga una funzione di regolazione del trofismo dei follicoli piliferi e delle ghiandole sebacee.

Alla luce di questi scopi viene fornito, in accordo ad un primo aspetto della presente invenzione, l'impiego come inibitore della 5-alfa-reduttasi di almeno una frazione vegetale ottenuta mediante estrazione con solvente idroalcolico da una pianta di *Boehmeria nippononivea*.

In particolare si è sorprendentemente verificato che l'estratto idroalcolico da *Boehmeria nippononivea* è un inibitore vegetale della 5-alfa-reduttasi altamente attivo nonostante abbia una bassa concentrazione di acidi grassi polinsaturi, convenientemente inferiore all'8% e vantaggiosamente compreso tra il 2-6% in peso. Tipicamente l'estratto dell'invenzione ha una concentrazione di acidi grassi polinsaturi compresa tra il 3,5 - 4,5% in peso. Si è così riscontrato che l'attività principale di inibizione sulla 5-alfa-reduttasi non è principalmente riferibile alla componente polinsatura, bensì a componenti con una minore lipofilia che non sono ancora state caratterizzate. Questo effetto è sorprendente poiché in passato si riteneva che l'azione di inibizione enzimati-



ca fosse essenzialmente da riferire alla componente lipofila "grassa" a base di acidi polinsaturi.

Convenientemente l'estrazione delle frazioni utili aventi attività inibitoria sulla 5 alfa reduttasi viene realizzata utilizzando una soluzione alcolica o idroalcolica con gradazione alcolica compresa tra 10° - 95° in volume.

Si è infatti riscontrato che con l'estrazione in ambiente idroalcolico è possibile ottenere un prodotto finale particolarmente ricco in sostanze vegetali attive nell'inibire selettivamente l'enzima 5-alfa-reduttasi, altamente espresso a livello dei follicoli.

Risultati ottimali nella preparazioni di frazioni vegetali attive si ottengono usando l'apparato fogliare di *Boehmeria nippononivea*.

Una tipica preparazione dell'estratto idroalcolico per gli usi dell'invenzione, comprende le seguenti fasi:

- Triturazione delle foglie e/o delle parti aeree di *Boehmeria nippononivea*,
- Determinazione del contenuto di acqua ed aggiunta di alcool etilico in modo da avere un rapporto droga/solvente in peso pari a circa 1:10.
- Estrazione, ripetuta due o tre volte fino ad esau-

rimento del materiale da estrarre

- Filtrazione e concentrazione dell'estratto mediante evaporazione del solvente ed essiccamiento dell'estratto.

In accordo ad una forma di realizzazione l'estratto vegetale si ottiene mediante:

- Pulizia della droga (foglie e eventualmente parti aeree)
- Essiccamento
- Macinazione, eventualmente criogenica
- Estrazione, convenientemente realizzata in un idoneo percolatore, preferibilmente con alcool di grado alimentare
- Chiarificazione convenientemente mediante centrifugazione
- Concentrazione del liquido
- Eventuale raffinazione mediante cromatografia
 - Concentrazione del liquido e
 - opzionale essiccamento, nel caso di preparazione dell'estratto secco.

Convenientemente la fase di estrazione delle sostanze attive di *Boehmeria nippononivea* viene realizzata utilizzando una quantità di solvente idroalcolico in rapporto tra 1:10 e 1:30 con il peso della droga da estrarre. Vantaggiosamente dopo la prima estrazione

viene realizzata una separazione della parte solida, o macerato vegetale, dalla componente liquida estratta ed un successivo lavaggio del residuo ottenuto con una quantità addizionale di solvente.

Successivamente l'estratto ricco in frazioni vegetali viene concentrato ad esempio mediante riscaldamento ad una temperatura convenientemente compresa tra 20 - 70°C.

Nella preparazione dell'invenzione vantaggiosamente si estraggono le frazioni attive mediante aggiunta di una soluzione idroalcolica in un quantitativo idoneo ad ottenere un rapporto sostanza vegetale/solvente in peso compreso tra 0,5:10 e 2:10 p/v.

L'estratto concentrato può essere utilizzato tal quale, oppure può essere concentrato mediante evaporazione fino a secchezza.

In accordo ad un altro aspetto della presente invenzione viene fornito l'uso di un estratto idroalcolico da Bohmeria Nippononivea per la produzione di un preparato per il trattamento dell'alopecia androgenetica o del defluvium telegenico.

Con il termine di preparato si intende comprendere composizioni fisiologicamente accettabili sia in forma solida che liquida, per la somministrazione orale o topica.

Convenientemente, le preparazioni a base di estratto idroalcolico di Bohmeria Nippononivea dell'invenzione sono utilizzabili sia per l'applicazione topica che per la somministrazione orale.

L'estratto idroalcolico di Boehmeria Nippononivea è efficace nel prevenire e/o trattare le affezioni determinate dall'attività della 5-alfa-reduttasi quali, ad esempio, seborrea, acne, foruncolosi, alopecia androgenetica, defluvium telogenico, diradamento dei capelli, ipertricosi e/o irtsutismo.

L'estratto idroalcolico di Boehmeria Nippononivea, in particolare con un contenuto di acidi polinsaturi inferiore all'8% trova un'elezione di utilizzo nel trattamento dell'alopecia androgenetica.

Le composizioni per l'applicazione topica dell'invenzione possono presentarsi sia nella forma liquida come lozioni, soluzioni sia in quella semisolido o solida come gel, crema, unguento, pomata, maschere, cerotti transdermici a rilascio protratto.

Convenientemente, le composizioni per l'applicazione locale dell'invenzione possono comprendere additivi comunemente utilizzati nelle preparazioni cosmetiche o farmaceutiche per l'uso locale, quali conservanti, agenti battericidi, stabilizzanti,



emulsionanti, tamponi, coloranti ed altri eccipienti comunemente utilizzati nelle tecniche di preparazione cosmetiche / farmaceutiche.

Nel caso della formulazione liquida, gli estratti vegetali idroalcolici attivi dell'invenzione possono essere convenientemente disciolti in un veicolo liquido coseticamente / farmaceuticamente accettabile quale acqua, alcool, soluzione idroalcolica, glicerica ed altri tipi idonei per l'applicazione locale.

A titolo di esempio, le composizioni dell'invenzione in forma liquida sono preparate dissolvendo le frazioni vegetali estratte idrosolubili in acqua e le rimanenti frazioni in alcool, per poi riunire le diverse frazioni sotto agitazione. La miscela risultante può quindi essere tamponata per raggiungere un intervallo di pH convenientemente selezionato tra 4 e 8 in maniera da essere compatibile con il pH della pelle per poi essere filtrata e confezionata in idonei recipienti quali bottigliette o fiale.

La composizione ad uso locale dell'invenzione trova utilizzo per applicazione, in un quantitativo efficace, direttamente sulla regione corporea interessata dalla affezione da trattare.

Ad esempio nel trattamento dell'alopecia andro-

genetica viene applicato una lozione a base di estratto idroalcolico di *Boehmeria Nippononivea* direttamente sul cuoio capelluto una o più volte al giorno convenientemente per cicli della durata di 2-3 mesi alternati da periodi di riposo.

In maniera similare una composizione in forma di crema può essere applicata una o più volte al giorno sul viso di un soggetto affetto per esempio da seborrea o acne, sino alla remissione della affezione.

Nel caso della formulazione solida o semisolida, i principi attivi vegetali anti 5-alfa-reduttasi sono dispersi in veicoli cosmeticamente / farmaceuticamente accettabili, comunemente utilizzati per l'applicazione locale.

L'applicazione della composizione dell'invenzione in forma di crema comporta una riduzione della secrezione di sebo da parte delle ghiandole sebacee che è visibile dopo pochi giorni di trattamento come una riduzione dell'untuosità della superficie corporea trattata.

Le composizioni dell'invenzione per l'uso orale possono essere realizzate in forma di integratori alimentari, prodotti dietetici, compresse, capsule, soluzioni liquide ed in forme per il rilascio controllato dei principi attivi.

La preparazione per la somministrazione orale dell'invenzione sono realizzate secondo le comune tecniche di preparazione dei prodotti dietetici e o farmaceutici, aggiungendo uno o più veicoli fisiologicamente accettabili ai principi attivi. Sono quindi utilizzati veicoli fisiologicamente accettabili in miscela con idonei conservanti, stabilizzanti, eccipienti, veicolanti ed aromatizzanti.

Tipicamente, nella composizione dell'invenzione l'estratto vegetale idroalcolico è presente in un quantitativo variabile, tipicamente compreso tra lo 0,001% in peso ed il 10% in peso, più preferibilmente tra lo 0,1 ed il 5% in peso.

Secondo un altro aspetto dell'invenzione viene fornito un metodo di trattamento cosmetico che comprende l'applicazione locale, a livello del cuoio capelluto o del viso, di un quantitativo efficace di un preparato o composizione precedentemente descritta.

In accordo ad un'altra forma di realizzazione viene fornito un metodo per regolare la produzione cutanea di sebo e il trofismo dei follicoli piliferi comprendente la somministrazione di un integratore dietetico del tipo precedentemente descritto ad un soggetto in necessità di trattamento.

In particolare la somministrazione della compo-



sizione dell'invenzione determina una riduzione nella secrezione di sebo con effetti benefici sulla regolazione della crescita fisiologica del capello, con una ricaduta favorevole su alopecia androgenetica e defluvium telegenico.

I seguenti esempi sono forniti a mero scopo illustrativo della presente invenzione e non devono essere intesi in senso limitativo dell'ambito di protezione come risulta dalle accluse rivendicazioni.

ESEMPIO 1

Preparazione di un estratto idroalcolico.

1 Kg di droga (costituita da parti aeree di *Boehmeria nippononivea*) finemente macinata viene umettata con una soluzione di alcool etilico al 50%, la droga così preparata viene lasciata a recipiente chiuso a TA per 12h. Si trasferisce quindi in un percolatore, si introduce solvente e si inizia la percolazione. L'operazione procede fino alla raccolta di circa 8 litri di solvente.

Si chiarifica per centrifugazione, il liquido surnanante viene concentrato con evaporatore sotto vuoto fino ad ottenere circa 2 litri di soluzione.

Questa soluzione viene essiccata per spray drying ottenendo circa 100g di estratto secco.

L'estratto viene setacciato per setaccio da 100 mesh

e raccolto in contenitori adatti allo stoccaggio.

ESEMPIO 2

Attività sulla 5 alfa reduttasi.

Il dosaggio della 5-alfa-reduttasi estratta veniva realizzato utilizzando lo schema allegato come Figura 1 e dettagliato come segue.

Steroidi marcati utilizzati [^{14C}] -T (Amersham, U.K.) sono stati usati come substrato marcato negli esperimenti. DHT titolato e 3alpha-diololo sono stati forniti da NEN (Research Product, DuPont Co., Boston, MA) e sono stati utilizzati per il calcolo dei materiali raccolti. Tutti gli steroidi radiomarcati sono stati purificati per routine mediante TLC prima di ogni procedura sperimentale.

Tessuto

I tessuti prostatici sono stati ottenuti da ratti maschi adulti (\approx 300 g peso) Sprague-Dawley, mantenuti in stabulari e in condizioni controllate (temperatura, umidità, esposizione alla luce: 14 ore di luce e 10 ore di buio). Gli animali sono stati alimentati con dieta a base di pellet standard e l'acqua è stata fornita ad libitum.

Preparazione del campione

I ratti sono stati sacrificati con ghigliottina e la prostata è stata prontamente rimossa, omogeneizzata,

mediante omogeneizzatore in vetro in tampone di fosfato. Il contenuto proteico dell'omogeneizzato è stato determinato mediante metodo di Bradford (Bradford, 1976). Circa 100 µg di proteine campione sono state incubate.

Le sostanze differenti sono state solubilizzate in tampone fosfato + 5% DMSO (concentrazione finale), sono state aggiunte all'inizio dell'incubazione alla dose finale di 5mg/ml e 0.5 mg/ml.

Condizione di incubazione.

Dopo l'aggiunta del substrato marcato ($[^{14}\text{C}]\text{-T}$, 3×10^{-6} M) e di un sistema generante NADPH (NADPH, sale disodico, 3.32×10^{-3} M; glucosio 6-fosfato, sale disodico, 11.76×10^{-2} M; glucosio 6-fosfato deidrogenasi da lievito grado 1, 3.5×10^{-2} UI; Boehringer Mannheim, Germany) ai tessuti omogeneizzati, le provette vennero incubate per 2h a 37°C in un shaker Dubnoff metabolico, sotto una corrente di O_2/CO_2 98:2; le provette connettenti il mezzo ed il substrato marcato, ma prive di omogeneizzati, sono state processate come bianchi. Al termine del periodo di incubazione, l'incubazione è stata fermata congelando ciascun campione; dopodiché sono stati immagazzinati a -20°C fino a estrazione e determinazione del DHT e finché si sono formati i metaboliti 3-alfa idrossila-

ti. Prima dell'estrazione sono stati aggiunti il DHT marcato e 3alfa-diololo a ciascun campione al fine di valutare il materiale recuperato. I metaboliti formati DHT e 3alfa-diololo, sono stati estratti con dietiletere, evaporati a secchezza e separati mediante TLC su piaste in gel di silice; il sistema di eluizione era costituito da diclorometano/dietil etere (7:1 v/v; tre volte at 4°C); quindi sono stati identificati con vapori di iodio, estratti ed è stata misurata la radioattività in un analizzatore liquido a scintillazione (Packard Tri-carb 1600CA). I quantitativi di steroidi formati/mg di proteine sono stati utilizzati usando uno specifico programma.

Esempio 3

Sono stati posti a confronto risultati di inibizione della 5-alfa-reduttasi di un estratto idroalcolico di Boehmeria con contenuto di acidi polinsaturi pari al 4% con altri inibitori di tecnica nota.

METABOLITA 3 ALFA		
	MEDIE ng/mg prot.	
NOME CAMPIONE	3-alfa	st.dev.
Controllo	78.118	12.54
Finasteride 10 ⁻⁸	30.235	0.343
Finasteride 10 ⁻⁷	15.276	3.53
Finasteride 10 ⁻⁶	11.687	0.724

Finasteride 10 ⁻⁵	8.079	2.437
Saw palmetto 0,5 mg/ml	20.723	4.078
Saw palmetto 5 mg/ml	7.075	1.881
Nipononivea tipo1 0,5 mg/ml	7.008	0.976
Nipononivea tipo1 5 mg/ml	2.828	2.514
Nipononivea tipo2 0,5 mg/ml	34.236	7.404
Nipononivea tipo2 5 mg/ml	1.906	1.874

METABOLITA DHT		
	MEDIE ng/mg prot.	
NOME CAMPIONE	DHT	st.dev.
Controllo	130.869	8.742
Finasteride 10 ⁻⁸	115.561	25.273
Finasteride 10 ⁻⁷	53.341	23.297
Finasteride 10 ⁻⁶	2.662	0.981
Finasteride 10 ⁻⁵	0	0
Saw palmetto 0,5 mg/ml	116.905	21.865
Saw palmetto 5 mg/ml	6.437	1.397
Nipononivea tipo1 0,5 mg/ml	91.76	3.969
Nipononivea tipo1 5 mg/ml	60.028	8.177
Nipononivea tipo2 0,5 mg/ml	117.936	3.437
Nipononivea tipo2 5 mg/ml	11.484	2.706

Gli stessi risultati sono rappresentati graficamente nella figura N. 2 in allegato. Come è ben visibile

dal grafico, con l'estratto idrolcolico di Boehmeria nippononivea dell'invenzione si ottengono valori di inibizione sulla 5 alfa reduttasi, in particolare del tipo 2, del tutto comparabili a quelli della finasterride e del Saw Palmetto.

ESEMPIO 4

Integratore dietetico a base di Boehmeria in compresse, idonee nel ridurre carenze alimentari nei casi di defluvium:

ogni compressa contiene:

Spermidina tricloridrato	0.50 mg
Calcio pantotenato	9 mg
d-Biotina	0.150 mg
Estr. idroalcolico con acidi polinsaturi 4% di	
Boehmeria nippononivea	100 mg
Ajuga reptans	5 mg
Zinco aminoacido chelato	7.5 mg
Rame aminoacido chelato	1.20 mg
Manganese aminoacido chelato ...	2.25 mg
Vitamina B6	3.0 mg
Acido folico	0.30 mg
Cellulosa microcristallina	17.0 mg
Calcio fosfato bibasico bidrato	62.0 mg
Idrossipropilmetilcellulosa	80.0 mg
Magnesio stearato	7.90 mg

Biossido di silicio 1.70 mg

ESEMPIO 5

Integratore in compresse idoneo per la prevenzione dell'alopecia androgenetica maschile e femminile.

Ogni compressa contiene:

Spermidina tricloridrato 0.50 mg

Calcio pantotenato 9 mg

d-Biotina 0.150 mg

Boehmeria nippononivea 100 mg

Quercetina 0.90 mg

Taurina 100 mg

Zinco aminoacido chelato 7.5 mg

Rame aminoacido chelato 1.20 mg

Acido folico 0.30 mg

Cellulosa microcristallina 90.0 mg

Calcio fosfato bibasico biidrato 80.0 mg

Idrossipropilmethylcellulosa 52.5 mg

Magnesio stearato 7.90 mg

Biossido di silicio 1.70 mg

ESEMPIO 6

Composizione per uso topico a base di Boehmeria per stimolare i bulbi piliferi e proteggere la cute da esposizione ai raggi UV

La composizione comprende:

Boehmeria nipponivea estratto idroalcolico
(5,9% ac. polins.) 0.5 g
Spermidina tricloridrato 0.50 mg
Calcio pantotenato 9 mg
d-Biotina 0.150 mg
Ajuga reptans 5.0 mg
Macrogol cetosteraril etere 5.0 g
Isopropile miristato 4.0 g
Glicole propilenico 3.0 g
Glicerina 3.0 g
VAselina bianca 11.0 g
Alcool cetilstearilico 9.0 g
Metilene paraossibenzoato 0.2 g
Propile paraossibenzoato 0.02 g
EDTA tetrasodico 0.1 g
Acqua 64.18

ESEMPIO 7

Composizione utile nel defluvium telogenico maschile
e femminile per uso topico a base di estratto idroal-
colico di Boehmeria :

Spermidina tricloridrato 2.0 mg
Calcio pantotenato 30.0 mg
d-Biotina 0.30 mg
Boehmeria nipponivea (estr. Alcolico con contenuto
di acidi polins. Pari a 3,6%) ... 100 mg



Ajuga reptans	5.0 mg
Beta glucano	0.50 mg
Fitotocotrienoli	20 mg
Estratto semi pompelmo	30.0 mg
Disodium Edta	3.0 mg
Cremophor	30 mg
Parfum	6.0 mg
Acido citrico	1.5 mg
Alcool denaturato	350 mg
Acqua	q.b. 10 mL

Ing. Barzanò & Zanardo Milano S.p.A.

/CA

RIVENDICAZIONI

1. Uso di un estratto vegetale idroalcolico di Boehmeria nippononivea per la produzione di una preparazione per inibire la 5-alfa-reduttasi.
2. Uso secondo la rivendicazione 1 in cui detto estratto vegetale idroalcolico di Boehmeria nippononivea ha un contenuto inferiore all'8% in peso di acidi grassi polinsaturi.
3. Uso secondo la rivendicazione 1 o 2 in cui detto estratto vegetale ha un contenuto di acidi grassi polinsaturi compreso tra il 2 ed il 6% in peso.
4. Uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-3 per la produzione di una composizione per la prevenzione o il trattamento dell'alopecia androgenetica e/o del defluvium telogenico.
5. Uso secondo la rivendicazione 4 in cui detta composizione è un integratore alimentare o un prodotto dietetico.
6. Uso secondo la rivendicazione 4 in cui detta composizione è idonea all'applicazione topica.
7. Uso secondo la rivendicazione 6 in cui detta composizione è una lozione per l'applicazione sul cuoio capelluto.
8. Uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni

ni 1-3 per la produzione di una composizione per la prevenzione o il trattamento dell'acne e/o della seborrea.

9. Uso secondo la rivendicazione 8 in cui detta composizione è per l'applicazione topica.

10. Uso di almeno una frazione vegetale ottenibile per estrazione con solvente idroalcolico da *Boehmeria nippononivea* avente un contenuto di acidi polinsaturi compreso tra 2-6% come inibitore della 5-alfa-reduttasi.

11. Uso secondo la rivendicazione 10 in cui detto estratto è ottenibile mediante

- macinazione di tessuti di *Boehmeria nippononivea*,
- estrazione mediante soluzione idroalcolica
- chiarificazione dell'estratto,
- concentrazione dell'estratto idroalcolico,
- concentrazione dell'estratto,
- essiccamento dell'estratto.

12. Metodo di trattamento cosmetico che comprende l'applicazione locale, a livello del cuoio capelluto o del viso, di un quantitativo efficace di una composizione comprendente almeno una frazione vegetale ottenute per estrazione con solvente idroalcolico da *Boehmeria nippononivea* (o *nippononivea*) ed avente un contenuto di acidi polinsaturi compreso tra 2-6%, in

associazione con un veicolo o eccipiente fisiologica-
mente accettabile.

Ing. Barzanò & Zanardo Milano S.p.A.

/CA

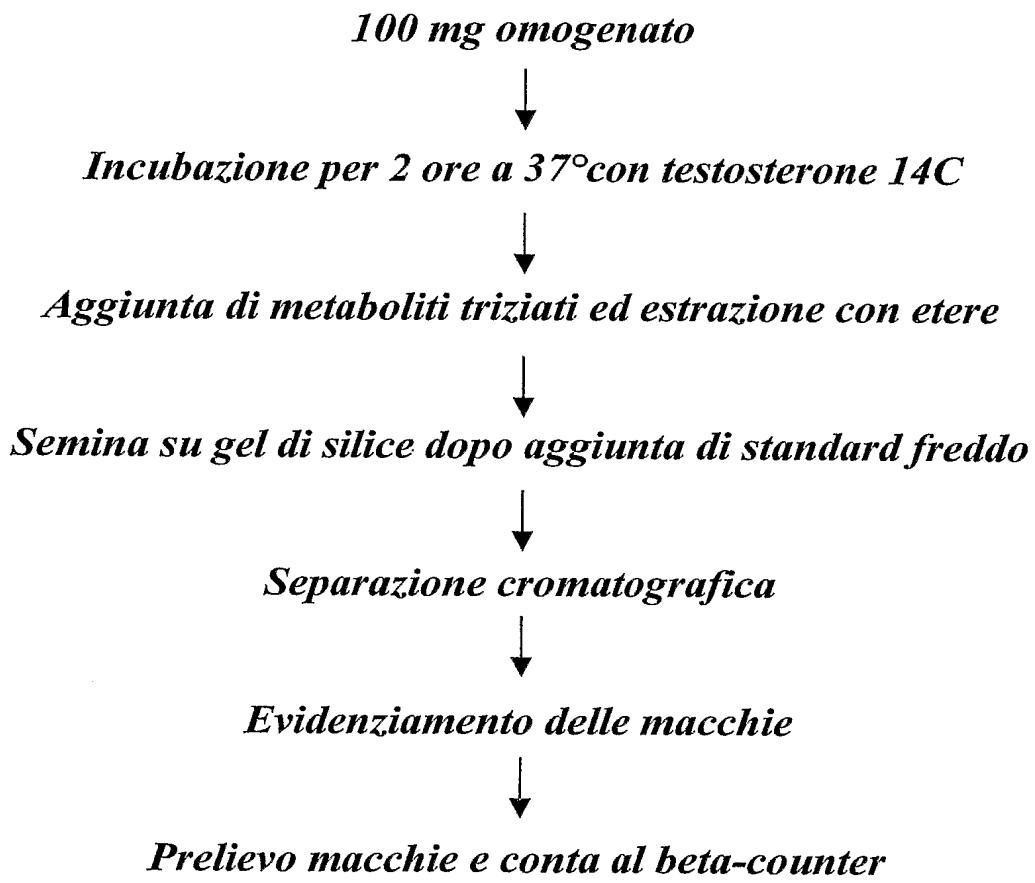
I MANDATARI.

(firma)

(per sé o per gli altri)

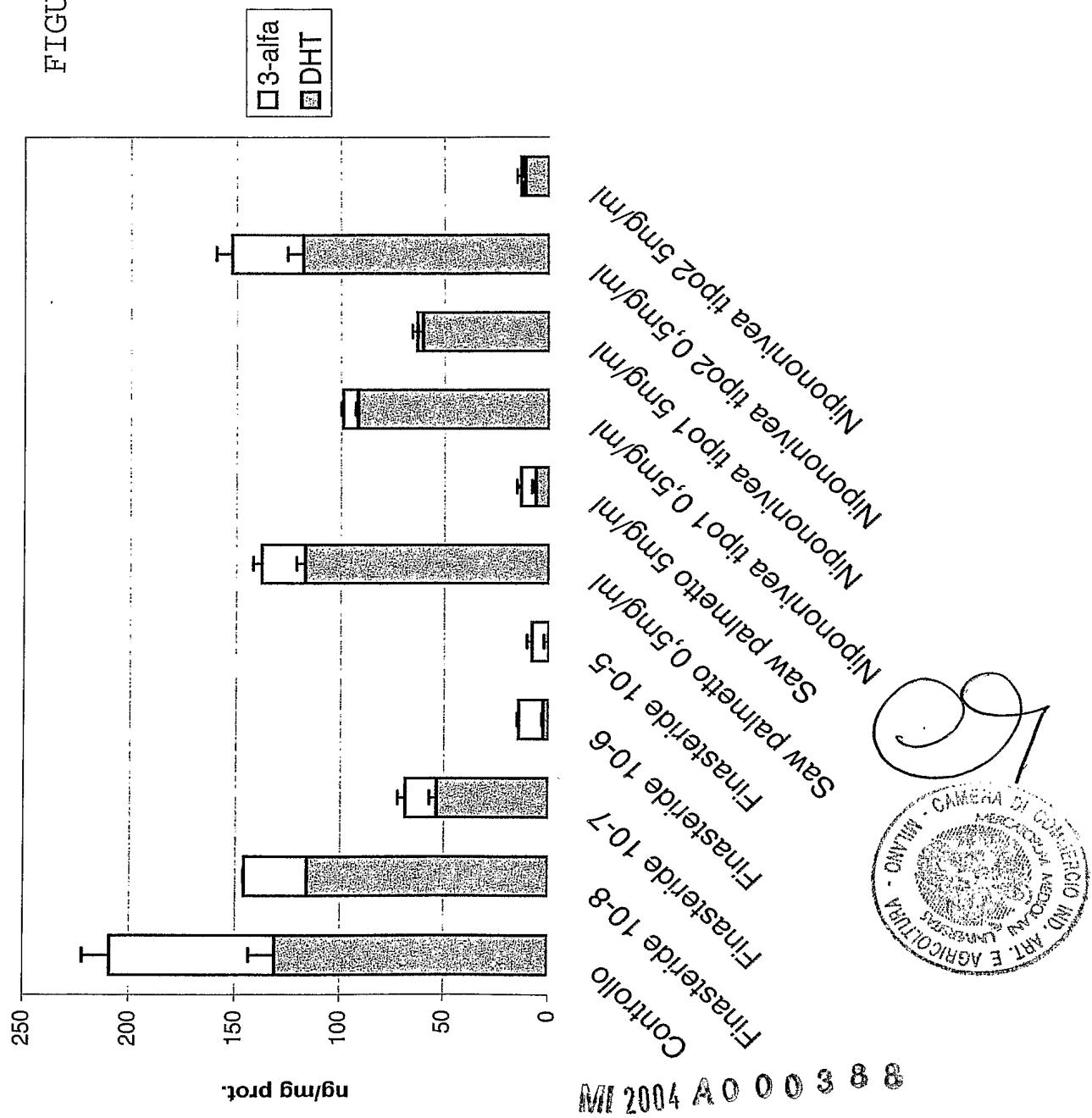


FIGURA 1



I MANDATARI
(firma) 
(per sé e per gli altri)

FIGURA 2



I MANDATARI
(firmate)
di giorno _____ anno _____